

氏名	かつ やま まさ と 勝 山 真 人
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 407 号
学位授与の日付	平 成 10 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	A Study on the Structure and Function of the Prostaglandin E Receptor Subtype EP2 (プロスタグランジン E 受容体サブタイプ EP2 の構造と機能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 市 川 厚 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 佐 藤 公 道

論 文 内 容 の 要 旨

プロスタグランジン (PG) E_2 は細胞膜リン脂質より切り出されたアラキドン酸より生ずる生理活性脂質の一種で、薬理的に分類された4つの受容体サブタイプ (EP1, EP2, EP3, EP4) を介して全身において多種多様な生理作用を示す。サブタイプ EP2 はアデニル酸シクラーゼの活性化に共役し、 PGE_2 による気管及び腸管平滑筋の弛緩や、免疫細胞の機能の抑制に関与することが知られている。また PGE_2 が全身の多くの組織や細胞で cAMP レベルの上昇を引き起こすことから、EP2 が全身に広く分布し、 PGE_2 の様々な作用を媒介するものと考えられてきた。しかし、同じくアデニル酸シクラーゼの活性化に共役するサブタイプ EP4 の存在が最近になって明らかになったことから、両受容体を選択的なリガンドを用いた研究は少なく、両者の機能が混同して理解されてきたのが実状であり、あらためて分子レベルで EP2 の機能を解明することが必要となってきた。そこで著者はマウス EP2 の cDNA と遺伝子を単離し、その構造、機能、分布、並びに発現調節機構を解明することにより、EP2 の果たす生理的役割について考察した。

第一章 The Mouse Prostaglandin E Receptor EP2 Subtype: Cloning, Expression, and Northern Blot Analysis

(マウスプロスタグランジン E 受容体 EP2 サブタイプ: クローニング, 発現, ノザンブロット解析)

マウス肺から単離した EP2 cDNA は、362個のアミノ酸よりなる7回膜貫通型の受容体をコードしていた。その構造は他の PGD 受容体サブタイプよりもむしろ PGD 受容体や PGI 受容体に高い相同性を示した。マウス EP2 を動物細胞に発現させ、その結合特異性を調べたところ、 PGE_2 、 PGE_1 及び EP2 の選択的アゴニストである butaprost が強く結合した。また同じ動物細胞を用いてマウス EP2 の情報伝達系を解析したところ、 PGE_2 及び butaprost が用量依存的に cAMP を生成した。ノザン解析によりマウス EP2 の臓器分布を調べたところ、EP2 の発現量は同じ情報伝達系を持つ PGE 受容体 EP4 サブタイプに比して極めて少ないものであった。高感度の検出を行うと、約 2.2kb と約 2.8kb のバンドが検出され、EP2 は子宮、脾臓、肺、胸腺、回腸、肝臓、胃等に広く分布することがわかった。

第二章 Distinct Cellular Localization of the Messenger Ribonucleic Acid for Prostaglandin E Receptor Subtypes in the Mouse Uterus during Pseudopregnancy

(偽妊娠マウス子宮におけるプロスタグランジン E 受容体サブタイプ mRNA の異なる細胞局在)

子宮において PGE_2 は平滑筋の収縮・弛緩、受精卵の着床時の血管透過性の亢進、また間質細胞の分化 (脱落膜変化) 等、極めて多彩な作用を示すことが報告されている。そこで、 PGE_2 の多彩な作用と受容体サブタイプとの対応関係を明らかにするため、子宮に発現している3つの PGE 受容体サブタイプの発現パターンを解析した。解析には子宮周期を同調さ

せた偽妊娠状態のマウスを用い、各サブタイプの mRNA の発現量の時間的変化をノザン解析で、また偽妊娠 0 日目 (PMSG 投与から 48 時間後) と 5 日目における発現部位を *in situ* hybridization により解析した。EP2 は偽妊娠 5 日目のみに高発現し、発現部位は管腔上皮に限局していた。EP2 の発現量は 5 日目をピークに増加した。0 日目には外縦筋層に弱く、5 日目には内輪筋層に強く発現していた。EP4 の発現量は 0 日目、1 日目には低かったが、3 日目以降は高く維持された。0 日目には管腔上皮に弱く発現していたが、5 日目には内膜の上皮、間質に広く分布していた。これらのことから、EP2 は受精卵の着床に、EP3 は子宮筋の収縮に、EP4 は間質細胞の脱落膜変化に関与することが考えられた。

第三章 Characterization of the Gene for the Mouse Prostaglandin E Receptor Subtype EP2: Tissue Specific Initiation of Transcription in the Macrophage and the Uterus

(マウスプロスタグランジン E 受容体サブタイプ EP2 遺伝子の解析: マクロファージと子宮における組織特異的な転写開始)

マウス EP2 には約 2.2kb と約 2.8kb の 2 種類の mRNA が存在し、偽妊娠 5 日目のマウスの子宮管腔上皮には約 2.8kb の mRNA が一過性に高発現する。またマクロファージ系細胞株 J774.1 細胞をリポポリサッカライド (LPS) で刺激すると、約 2.2kb の mRNA が誘導される。そこでこれら 2 種類の EP2 mRNA 分子種の構造、並びに両者の転写調節機構を解明する目的で、マウス EP2 遺伝子を単離し、その構造を解析した。マウス EP2 遺伝子は 2 つのエキソンと 1 つのイントロンから構成され、第 1 エキソンは 5'-非翻訳領域から第 6 膜貫通領域までを、第 2 エキソンは第 6 膜貫通領域から下流をコードしていた。子宮からの EP2 cDNA の単離、ノザン解析、プライマー伸長法による解析などから、子宮型 mRNA の転写開始点はマクロファージ型のそれよりも 645 ベース上流にあることがわかった。またマクロファージ型 mRNA が様々な臓器に発現するのに対し、子宮型 mRNA は子宮のみに発現していた。EP2 遺伝子の 5'-上流域には、LPS 刺激による遺伝子発現に関与する配列や、プロゲステロン応答配列が見出された。

以上、著者はマウス EP2 が着床時期の子宮管腔上皮や LPS 刺激したマクロファージにおいて誘導合成されること、及びその誘導には異なる転写開始機能が存在することを明らかにした。本研究は、刺激に応じて誘導される EP2 受容体を介して PGE₂ が生体にとって極めて重要な作用を発現することを示唆するものであり、EP2 に選択的な PGE₂ 誘導体の新たな臨床応用への可能性を提起するものと考えている。

論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン E₂ 受容体の 4 種類のサブタイプのうち、EP2 と EP4 はともにアデニル酸シクラーゼを活性化し、PGE₂ の多様な生理作用の発現に機能している。EP4 サブタイプの構造と機能は最近明らかにされたが、EP2 サブタイプは検討されていなかった。本論文は、マウス EP2 サブタイプの構造と機能、組織分布、発現調節機構について解析し、その生理的役割について考察したものである。まず著者は、マウス肺からクローニングした EP2cDNA は 362 個のアミノ酸よりなる 7 回膜貫通型の受容体をコードし、その構造は他の PGE₂ 受容体サブタイプよりも PGD₂ 受容体、及び PGI₂ 受容体に高い相同性のあることを見出した。次いで、動物細胞に発現した EP2 は PGE₂、及び EP2 の選択的アゴニスト butaprost を強く結合して、用量依存的に cAMP を生成することを明らかにした。また、EP2mRNA は約 2.2kb と約 2.8kb の 2 種類が存在し、子宮、次いで脾臓、肺、胸腺、回腸、肝臓等に分布していることを明らかにした。更に、子宮での EP2mRNA の発現が性周期と密接に関連していることを見出し、偽妊娠状態にしたマウス子宮を用い、PGE₂ の 4 種類のサブタイプ mRNA の発現量の時間的変化をノザン解析で、また、偽妊娠 0 日目と 5 日目における発現量を *in situ* hybridization により解析した。その結果、EP2 は偽妊娠 5 日目の管腔上皮に限定して高発現することを見出し、受精卵の着床に機能することを示唆した。他のサブタイプについても解析し、EP3 が 0 日目には外縦筋層に弱く、5 日目には内輪筋層に強く発現し、子宮筋の収縮に機能すること、また、EP4 は 5 日目に内膜の上皮、間質に広く分布し、間質の脱落膜化に機能することを明らかにした。更に著者は、マウス EP2 にある 2 種類の EP2mRNA について、偽妊娠 5 日目のマウスの子宮

管腔上皮には約 2.8kb の mRNA が一過性に高発現するが、LPS で活性化したマクロファージでは約 2.2kb の mRNA が誘導されることを発見した。そこでマウス EP2 遺伝子を単離し、これら 2 種類の EP2mRNA の分子種の構造、ならびに両者の転写調節機構を解析した。遺伝子は 2 つのエキソンと 1 つのイントロンから構成され、第 1 エキソンは 5'-非翻訳領域から第 6 膜貫通領域までを、第 2 エキソンは第 6 膜貫通領域から下流をコードしていることを明らかにした。次いで、子宮型 mRNA の転写開始点はマクロファージ型のそれよりも 645 ベース上流にあり、mRNA は子宮のみに発現するのに対し、マクロファージ型 mRNA は様々な臓器に発現していること、また、5'-上流域にプロゲステロン応答配列と LPS 刺激による遺伝子発現に関与する配列のあることを発見した。これらの成果は、マウス EP2 が着床時期の子宮管腔上皮や LPS 刺激したマクロファージにおいて誘導合成されるが、その誘導には異なる転写開始機構が存在することを初めて示唆するものである。

以上、本研究は EP2 の構造、機能、組織分布、発現調節についていくつかの新しい発見をし、EP2 を介する PGE₂ の生理作用の発現について分子レベルから考察を加えたものである。よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成10年2月19日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。